Production of poly-beta-hydroxybutyrate in transformed escherichia coli

Publication number: JP5507410T Publication date: 1993-10-28

Inventor. Applicant: Classification:

- international: C12N1/21; C12N15/52; C12P7/62; C12N1/21;

C12N15/52; C12P7/62; (IPC1-7): C12N1/21; C12N15/52; C12P7/62; C12P7/62; C12R1/19

- european:

C12N15/52; C12P7/62A

Application number: JP19910510838T 19910520

Priority number(s): WO1991US03547 19910520; US19900528549

19900525

Also published as:

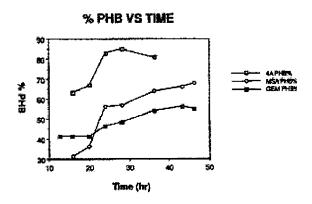
WO9118993 (A EP0535065 (A1 US5334520 (A1 FI925333 (A)

EP0535065 (A0

Report a data error he

Abstract not available for JP5507410T Abstract of corresponding document: US5334520

Methods are provided for enhancing the production of PHB from a transformed E. coli host which includes the genes coding for the PHB biosynthetic pathway. By inserting the genes coding for PHB into a host which includes a lactose utilization system, a low cost minimal medium including whey can be used as the fuel and carbon source for PHB production. A plasmid which codes for the PHB biosynthetic pathway plus four hundred extra bases on either side of the first and last genes in the pathway has been inserted into the host and has been shown to produce a larger amount of PHB accumulation in a shorter period of time than other plasmid constructs. CaCl2 has been shown to be an effective agglomerating agent for agglomerating PHB which has been produced in a transformed E. coli host.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

®日本国特許庁(JP)

① 特許出願公表

⑫公表特許公報(A)

 $\overline{\Psi}5-507410$

個公表 平成5年(1993)10月28日

@Int. Ct. * C 12 N

識別記号

庁内整理番号

審 査 請 求 未請求 予辦審查請求 有

部門(区分) 1(1)

15/52

7236-4B

8931-4B

C 12 N 15/00

Α×

(全 7 頁)

会発明の名称 形質転換したエセリキヤ・コリにおけるポリーβーヒドロキシ酪酸塩の改良生成

簡 平3-510838

经20出 職 平3(1991)5月20日 69翻訳文提出日 平4(1992)11月25日

極度際出版 PCT/US91/03547

國国際公開日 平3(1991)12月12日

@1990年5月25日@米爾(US)@528,549 優先権主張

四分発明 者 デニス、ダグラス・イー

アメリカ合衆国22486パージニア州、ウエイヤーズ・ケイブ、ポッ クス92エイ、ルート 2番

センター・フオー・イノベイテ の出 願 人

アメリカ合衆国22070パージニア州、ハーンドン、ロック・ヒル・ ロード 2214番、スイート600、スイアイテイ・ビルデイング

イブ・テクノロジー 葆 外2名

20代 理 人 弁理士 青山 倒指 定 国

AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域

特許), Fl, FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), IT(広域特許), JP, KR, LU(広域特

許),NL(広域特許),SE(広域特許)

最終頁に続く

請求の処理

このように私の発明を述べたように、私が新規なものとして請求し、特許証に より確保することを望むものは以下の通りである。

- 1、ポリーターとドロキン部数理生合成経路をコードするデオキシリボ技動を 含んでいるベクターにより形質転換されたラクトース利用系を有するエセリキヤ・ コリ細菌宿主。
- 2. 技デオキシリボ核酸配列が、技ポリー8ーとドロキシ整理塩生合成経路に おいて、3つの遺伝子配列の最初の前の数デオキシリボ核酸配列に位置する最初 の4003クレオンド塩基及び放ボリー8-ヒドロキシ酪酸塩生合成経路におい て終るつの遺伝子配列の第3の後の餃ヂオキシリボ核酸配列に位置する第2の4 0 0 ヌクレオンド塩基をほぼ含む請求項1のエセリキア・コリ報復宿主。
- 3. 以下のATCC寄託者号68329を有する第攻項2つのエセリキア・コ **リ網筋探索。**
- 4. 旅宿主のエセリキア・コリ株HMS174から誘導される請求項1のエセ リキア・コリ細菌産主。
- 5. はベクターがプラスミドップ218日である調収項1のエセリキア・コリ 細菌病生。
- 6. ポリーβーヒドロキシ酸酸塩を合成経路をコードするデオキシリボ核酸塩 列を含んでいるベクターにより形質転換されたエセリキア・コリ細菌瘤主であっ て、蚊エセリキア・コリ細菌療主は、歯収しうる量においてポリーターヒドロキ シ酪酸塩を生成するため炭素類としてホエイを用いることができる。
- 7. 旅デオキシリボ格段配列が、鉄ポリーターヒドロキシ路蔵塩生合変経路に おいて3つの遺伝子配列の最初の前の旅デオキシリボ核酸配列に位置する最初の 400ヌクレオシド塩基及び鉄ポリーβーヒドロキシ酪酸生合成範疇において鉄 S つの遺伝子配列の第3の後の数デオキシリボ核酸配列に位置する第2の4 C ○ ヌクレオシド塩基をほぼ含む請求項6のエセリキア・コリ細菌宿主。
 - 8、ポリーβーヒドロキシ緊酸塩生合成経路をコードするデオキシリボ核酸配

別を含んでいるベクターにより形質転集されたエセリキア・コリ細胞衛主であっ て、放エセリキア・コリ細菌宿主は回収しうる量においてポリー8-ヒドロキシ 整弦道を生成するため食物質として最小増進を用いる能力を有する。

- 9. 数デオキシリボ核酸配列が、数ポリーガーヒドロキシ熟確塩生合成経路に おいて、3つの遺伝子配列の最初の前の接デオキシリポ核酸配列に位置する最初 ○400ヌクレオシド塩基及び装ポリーβーヒドロキシ酪酸塩生合成経路におい て終るつの遺伝子配列の第3の後の数デオキシリボ核酸配列に位置する第2の4 0 0 ヌクレオシド福事をほぼ合む飲水項8のエセリキア・コリ帳間復去。
- 10. 最小培地及びホエイを含む形質転換されたエセリキア・コリ宿主にポリー βーヒドロキシ国際権を生成するための結準であって、該形質転換されたエセリ キア・コリ宿主はポリーβーヒドロキシ監歉塩生合成経路を含み、ポリーβーヒ ドロキシ酸酸塩の生成のため炭素厚として鉄ホエイを利用する能力を有する。
- 11. 該最小増増が該増地の約20%であり、該ホエイが該増地の約40%であ り、そして水が鉄堵地の約40%である筒水項10の熔地。
- 12. 0.6844-t> NatHPO.
 - 0.3%/-- t> FKH 1PO4
 - 6.1%パーセント塩化アンモニウム、
 - 0.05%パーセント集化ナトリウム、
 - 58.84%パーセント水、
 - 0.012%パーセント硫酸マグネシウム、
 - 0.0005%パーセントチアミン。
 - 0.01%パーセントカザミノ酸及び
 - 40%パーセントホエイ溶液

をほぼ合む、形質転換されたエセリキア・コリ種主にポリーβーヒドロキシ酸酸 塩を生成させるための培地。

18. 以下の設階を含むポリーターヒドロキシ整璧の製造法。

エセリキア・コリ細菌宿主の培養を供給すること、各宿主はラクトース利用系

そ有し、各審主は、ポリーターヒドロキシ融散塩生合成経路をコードするデオキ シリボ拡散配列を含んでいるベクターにより形質転換されている。

ホエイを含んでいる是小場地に24時間よりも大の期間、エセリキア・コリ細 国電主の鉄塔差を生育すること、数エセリキア・コリ細菌電主の各々は細胞内の ボリーβーヒドロキン森駅塩を生成する。

族培養中に該エセリキア・コリ朝面確定を溶解し、溶液中に該ポリーβ−ヒド ロキン路酸塩を放出すること、及び

飲ポリーターヒドロキシ酪酸塩を集めること。

14. 集めることの該政階が溶解したエセリキア・コリ細胞宿主及びボリーβー ヒドロキン路散塩を含んでいる該溶液を開散マグネシウム、塩化マグネシウム、 断酸マグネシウム及び塩化カルシウムからなる繋から選ばれたイオン試集にさら す政階を含み、該イオン試験は該ボリーβーヒドロキン路散塩を塑化するのに十 分な差度である検求項13の方法。

15. 該イオン溶液が1モルと1ミリモルの間にわたる濃度で塩化カルシウムである釜吹項14の方法。

- 18. 塩化カルシウムが約10ミリモルの濃度を有する糖水項15の方法。
- 17. 以下の最階を含むポリーターヒドロキシ路壁の製造法。

エセリキア・コリ細菌審主の培養を供給すること、各権主はポリーβーヒ ドロキン開散権生命成経路をコードしているデオキンリボ接触配列を含んでいる ベクターにより形質転換されており、各権主はポリーβーヒドロキン指数権の生 成のために従業派としてホエイを用いる能力を有する。

ホエイを含んでいる最小塔地に24時間より大の開発エセリキア・コリ細菌宿 主の試験景を生育すること、該エセリキア・コリ振調宿主の名々は無胞内のポリ - 8-ヒドロキシ転動類を建設する。

放培差に該エセリキア・コリ細胞宿主を溶解し、溶液中に該ポリーβーヒドロ キシ器整体を放出すること、及び

絃ボリーターヒドロキシ猕糠塩を集めること。

明報書

形質転換したエセリキヤ・コリにおけるポリーカーヒドロキシ路敷塩の改長生 政

技術分野

本発明は、一般にポリーβーヒドロキシ酸酸塩(PHB)生合成繊維をコードしている遺伝子を有しているベクターにより遺伝的に形質転換されたエセリキヤ・コリ(イー、コリ)を用いるPHBの生成に、より詳しくは形質転換されたイー、コリでのPHBの能率的生成に関する。

背景技術

PHBは環境ストレスに対する種々の細菌により生成されるエネルギー貯蔵材料であり、ボリプロピレンに似た性質を育するDー(ー)ー3ーヒドロキン酸酸塩のホモボリマーである。PHBは生物分類できるので、ヒトのごみの環境影響を延ずるために他のプラスチック材料とは対風的にパッケージする当的にPHPを解いることにかなりの興味がある。PHBは又、抗生物質、ドラッグ・デリバリー、医学総合及び骨重検適用に有用性を有する。PHBはアルカリゲネス・エウトロフス(エイ。エウトロフス)から商量的に生成され、商品名バイオポールの下に販売される。

スラター等による文献「クローニング・アンド・エスクプレッション・イン・エセリシア、ロリ・オブ・ジ・アルカリゲネス・エウトロフス氏-16ポリーBードロキンプチラート・パイオシンセティック・パスウェイよ、ジャーナル・オブ・バクテリエロジイ、170差10号、1988年10月、4431-4436頁に記載されるように、イー。コリは、PHB集会成経路をコードするエイ、エウトロフスから遺伝子で遺伝的に形質転換できることが示された。イー。コリは、細菌、イー。コリを取扱うについてより知られているので、即ち、イー。コリはより容易に調節され、扱われるので、エイ、エウトロフスよりもPHBを集成するのによりはるかに良好なペクターである。形質転換したイー。コリは比較的大量にPHBを発揮し得た。

18. 以下の政階を含む形質結集されたエセリキア・コリ無菌店主の培養に、細胞内に生成したポリーβーヒドロキシ膨散塩を回収する方法であって、装御主はポリーβーヒドロキシ膨散塩生合成経路をコードしているデオキシリボ核酸配列

該エセリキア・コリ報酬額主を溶解して高波中に該ボリーβーヒドロキシ階酸 塩を放出すること。

確設マグネシウム、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウム及び塩化カルシウム からなる群から選ばれた十分量のイオン試薬を加えること、餃子分量の餃イオン 試異は餃溶液中、餃ボリーガーとドロキシ酪酸減を固化する、及び

数据核を進心して設固化したポリーターとドロキシ路散塩をペレット化すること。

18. 誰イオン試棄の塩化カルシウムである請求項18の方法。

を含んでいるベクターにより形質転換されている。

- 20. 鉄塩化カルシウムが1モルと1ミリモルの間にわたる油度で存在する策求 項18の方法。
- 21. 岐塩化カルシウムが約10ミリモルの建度で存在する請求項20の方法。
- 22. ポリー β ーヒドロキシ酪製塩生合成産路において、3つの遺伝子配列の最の前のDNA室列に位置する最初の400のアクレオシド塩高及びポリー β ーヒドロキシ酸酸塩生合成経路において、3つの遺伝子配列の第3の後のDNA配列に位置する第2の400のアクレオシド塩高をほぼまんでいる精製され、分離されたDNA配列。

23. p4Aとして設計され、寄託書号58328の下にエセリキア・コリ禁打 M5174がジ・アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託された プラスミド。

- 24. ベクターがp4人プラスミドを含む請求項13の方法。
- 25. ベクターが04人プラスミドを含む請求項17の方法。
- 28、ベクターが94Aプラスミドを含む請求項18の方法。

他の材料以上のPHBの利点にもかかわらず、生成が高価であるので市場での 実施を妨げて来た。最近PHBは、ルリアプロス(LB)にイー、コリを生育し、 炭素原としてグルコースを用いることにより形質転換したイー、コリを生成させる。PHBの生成コストの約1/8はLBに含んだ着施及びグルコースのコスト に帰すことができる。高価でない炭素原を利用できればPHB生成の全体のコストは含意に減ずることができる。加えて、PHB生成の全体のコストの多くは、 イー、コリ中に生成されたPHBを精製するのに帰すことができる。最近、PHBは進心、次いで細胞の機械的溶解によりPHBを放出し、高温知識でPHBを 固りとし、最低にスプレードライ段階で精製された粒子を得ることにより精製する。もしイー、コリからPHBを集める高価でない方法が入手できれば、PHB生成の全体のコストは有意に減ずることができる。

発明の開示

従って、形質転換されたイー、コリにPHBを生成する改良された技術を提供することが本発明の目的である。これまでのイー、コリより高いレベルでPHBを審接でき、生育条件のためにホエイを含んでいる最小特地を用いることができる形質転換されたイー、コリ体を提供することが本発明の他の目的である。

イオン終校を用い落解したイー。コリ細胞からPHB粒子を聞まらせる方法を 提供することが本発明のさらに他の目的である。

本発明により、イー、コリの株、即ちイー、コリHMS174がPHB生合成 経際及び経路の上流及び下洗網の約400の余分の塩基を有するプラスミドを含 んでいるベクターにより形質転換された。イー、コリのHMS174株は、それ がラクトース利用系を含み、組換え欠損で、そのためラクトース適伝部分を含ん でいるプラスミドが組換えられず構造物を不安定にしないので選ばれた。ホエイ はチーズ製造からの廃棄生成物で非常に安い。形質転換したイー、コリの味がホ エイを含んでいる最小増地で生育し約85%のPHBの平均収率(PHBを模重 量/金細胞を検重量)を有することを示す実験がなされた。加えて、形質転換さ れたイー。コリに生成したPHBは標々のイオン溶液で回りうることを示す実験 がなされた。複製されたPHBを大量に回収するため、影質転換されたイー、コリ和線はまず機械的または物理的手段、例えば音波処理により又は運伝的手段により落解する。次いで網線は、イオン溶液、例えば100ミリモル(aM)塩化カルシウム(CaCl₂)中でインキュベートし、PHB粒子を勧める。最後に固まりは低速度で停養物から遠心する。実験は、培養物中のほとんど全て(100%)のPHBかこの方法により到り、回収されることを示す。結果は、同じ型の固化がエイ、エウトロフスからPHBを回収するには不可能であるので特に刺激的である。

図面の簡単な説明

前途の及び他の目的、最面及び利点は、関面を引用して本発明の好ましい実施 実際の以下の幹権な記載からよりよく電景されよう。図において、

図1は、P月日若徳対異なるプラスミド検避物を含んでいる種々のイー。コリ クローンへの時間を示す線グラブである。

類2a及び2bは最小増増及びホエイを高い形質転換されたイー。コリにより生成したPHBの蓄積を示す棒グラフである。

図3は、CaClaを用いるPHB値化のパーセントを示す物グラフである。

図4は、PHB面化対PHBが放射標準グルコースの存在で響積し、次いで圏 化手能に付きれる時間を示す機グラフである。そして、

図5は、PHB圏化へのガラス牛乳及びカルシウムの対照的効果を示す輸グラフである。

発明実施のベストモード

図面、より詳しくは図1を引用して、プラスミドp44を含んでいるイー、コリ株HMS174は、異なるプラスミド構造物を含んでいる他のイー、コリクローンよりも短い期間により大きなパーセントのPHBを蓄積することを示す。イー、コリ株HMS174はエイル・イー、コリ・ストック・センター、パーパラ・バックマン、支配人から入手できる。p4eプラスミドはPHB生合成経路及びベクターpT2-18U上PHB生合成経路の上派及び下液制に約400の余分の塩

ロックヴィル・Mdのジ・アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに等 狂され、察託書号68629を有する。

p4aプラスミドで形質転換したイー、コリのHMS174株がホエイを含んでいる最小特性に生育できることを示す実験が行なわれた。用いられた最小特地はほとんどの報生物学的生物学チキストに記載されるM9最小培地であった。乗1はM9最小培地の5X機械物の処方を表示し、表示した成分の各々は1リットルフラスコに加え、水は1リットルまで加える。

表1

5 XMの最小熔粒処方

3 Os NazHPO

15g KH1PO.

5 NH C1

2.5g NaC1

ホエイは、シグマ・ケミカルズからウシホエイの粉末として得、100mlの最終審量を育する水に20gのホエイを撹拌することにより作った。 撹拌は約30分値ゆるやかに加熱して行なった。次いでこの搭板をオートクレーブにかけ、進心の間沈澱した粒子を10分間10.000×gで遅心することによりペレットとした。残っている上清をホエイ炭素額として用いた。

実験では、ブラスミド948を含んでいるドMS174イー。コリ株を平板培養 から50mlのM9最小培地+ホエイ溶液に接種した。表2は、8%の最軽速度で ホエイを含んでいる50mlの最小培地から処方を表示する。

表 2

P 刊 B 生成府最小特域+ホエイ 10ml 5×M 9 特地 20ml ddH m (2回華常水) 50ml 1 MM m S O 4

Sel O. 5州チアミン

を有する。ベクターpT 2-18 Uはユナイテッド・ステイツ・バイオケミカルズから入手できる。MS Aは、ベクターpT 2-18 U上にPHB生合成経路及び他の連合プラスミド上にファージphi X 17 4からのE一端解遺伝子を有する。MS Aは、それがPHB生合成経路の上流に約400余分の塩基を有することでp4aと異なる(即ちPHB生合成経路はpT 2-18 Uにクローンされて「MS A」と呼ばれるpT 2-18 U-PHBを作り、P4 Aは、プロメガ・コーボレーションから入手できるベクターpGEM-7ドナ上のPHB生合成経路の上統例上のpT 2-18 U-PHB 400より少ない塩基である。

p4A.pT2-18U-PHB(MSA)及びpGEM7t-PHB(GEM)クローンは、全て、慣用の分子クローン化技術を用い上で引用し、組入れられた同時係順特許出顧及び維維論文で検討されたFHB生合成器基を含むイー、コリクローンから構成された。特許出題及び維維論文で開示したように、PHB生合成経路はエイ、エウトロフスから分離し、イー、コリで発現できる。生金成経路は均ちキロ塩基の長さでβーケトテオラーゼ、NADP-純合アセトアセチルーコエンザイムA(CcA)レダクターゼ及びPHBシンテターゼをコードする塩基を含んでいる。図1はMSA及びGEMクローンがP4Aクローンほど多くPHBを生成しないことを示す。

イー、コリHMS174はそれがラクトース利用系を含み、そしてそれが複換 え欠機であるので存主として遅んだ。組換え欠損は、ラクトース運伝部分を含ん でいるプラスミドが組換えせず、構造物を不安定にしないことを保証する。以下 に述べるように、HMS174でのラクトース利用系の存在により、ホエイ、キ の主成分がラクトースであるチーズ製造廃産生成物はPHB生成の炭素原として 用いられる。形質転換されたイー、コリ株を作るについて、PHB生合成総路プ ラス ユナイテッド・ステイツ・バイオケミカル・ベクターPTZー18Uにク ローンされたPHB生合成総路の400塩基上流及び下流であるプラスミドP4s はイー、コリHMS174に電気放布される。P4Aプラスミドを含んでいるイ ー、コリの株は、1990年5月23日に12301パークローン・ドライブ・

250m1 20%カザミノ酸

20ml 20%ホエイ溶液

接着した格表は250s1じゃま複付(baffled)フラスコ中300rpaでオービタ ルインキュペーターシェーカーで37℃で4日時間生育した。48時間のインキュ ペーション時間後、培養を止めて細胞を集めた。ガスクロマトグラフィーを用い てPHB含量を分析した。

図2s及び2bはそれぞれ、細菌の全重量で割った細胞当りのPHB重量として 要わした細胞中に審要したPHBのパーセント及び最小特地を有する溶液中の異 なる濃度のホエイに対し、配/slでなした会PHBとして表わした細胞中のPH Bの収益を赤す。図2s及び2bは、非常に低速度のホエイ、即ち維液中2%でき え、高濃度のPHB管板(即ち90%より大)及び高収量のPHB(即ち約10nl /sl)であることを示す。図2s及び2bが高い濃度のホエイを有する培地がより 大きな濃度及び収量のPHBを生成する傾向があったことを示す一方、ホエイ濃 医が8%を超えた後、PHB生成が下り始めることが認められた。

上の実験で、PHB生成は48時間のインキュペーション後分析されたが、有 度なPHB住成が24時間のインキュペーション後、観察されたことに注意すべ 象である。加えて、5 X最小培地処方でのNagHPO。、NH4C1及びNaC1の 比較調度及び5 X最小培地、2 図無部水、MgSO。、テアミン、カザミノ酸及び ホエイ溶液の比較濃度は変えることができ、一方ラクトース利用系を有する形質 転換されたイー。コリ帯主で依然としてPHBの生成がなされることが予期され

ホエイが長小塔地に存在するP月3の生成に炭素質としてホエイを用いることは、PHB生成にグルコースを伴う高い塔地を用いる先行技術の復行を除えてかなりの費用卸越となることが期待される。PHB生合成経路をコードしているプラスミドを有し、同時保護等計劃預及び被誌路文で検討された先行技術の影質を 焼きれたイー。コリ細胞は、それらの細胞がここに存在するラクトース利用系を有しないので、炭素質としてホエイを用いて生質できなかった。PHBは、その 銀書もラクトース利用系に欠けるので、その炭素原としてホエイを用い自生の信主、アルカリゲネス・エウトロフスに生成され得ない。加えて数1に示されるように、特殊なプラスミドp4aで特殊なイー。コリ宿主を形質転換することは、イー、コリがPHB生命放極略をもコードする異なるベクターで形質転換された場合よりも高いパーセントでPHBを生成させる。

P日日はその急生の宿主(エイ、エウトロフス)よりむしろイー、コリに生成されているので、出頭人は形質転換されたイー、コリにより生成したPHBポリマーはエイ、エウトロフスに生成したPHBとは異なる物理的性質を育すると信じた。特に出頭人は、形質転換されたイー、コリにより生成されたPHBが機々のイオン神経によって悪化できるかを創生するため実験を行なった。実験によって、PHBは、上で取込まれた同時係無関待許出原及び略誌論文で検討したように形質を換されたイー、コリに生成した。簡単に云うと、PHB一生成体を1%グルコースを含んでいるルリアプロス(LB)中24時間37℃で振進プラスコ培養で生育する。細胞を承心(2.000×25分)によりペレットとし、次いで元の培養と等しい容量の水に再び原稿する。細胞を次いで音波処理により整解し、後々のイオン試真を潜被に加えた。表3は種々のイオン溶液による形質転換されたイー、コリに生成したPHBへの集合効果を示す。

表 3

溶液+	集合程度**
KH.PO.	++
NaC1	+
CsC1	-
MgSO.	+++

種々のイオン溶液によるPffBの集合

MgC1: +++
(NH4):HPO4 +

K,HPO.

CaCleのより間まるPHBのパーセント対溶液に残るPHBのパーセントを 決定するために実験がなされた。実験において、イー、コリのPHB一生成体は 1対放射機識グルコースを含んでいるルリアプロス中、2 4時間3 7℃で援握フ ラスコ培養で生育した。個数は達なく2、000×g5分配)によりペレットとし、 次いで元の結差に等しい容量の水に再び影響した。次いで細胞を音波処理により 途解し、次いで溶液を1 M塩化カルシウム貯蔵の築地により1 0 aMとした。管 を10分蓄温でインキュペートし、次いで400×g2分間域心した。固化した PHB型子がベレット化し、一方多くの細胞残骸が上滑液に残った。次いで上満 を吸引した。ペレット及び上滑におけるPHBの分配を開定するためペレットと 上滑を毛細管ガスクロマトグラフィー又は枚体シンチレイション計数を用いて満 定した。

図3は培養におけるほとんど会て(100%)のPHBが上記方法により図化し 図収されたことを示す。この実験でPHBの量はガス毛術管クロマトグラフィー でのみ表定した。この実験はフラスコの容量が関化の程度に影響するかどうかを 別定するため最つかの箱物容量で行ない、全ての容量において、全てのPHBが 圏化し、遠心により実質的にペレット化することが利った。

図4は培養は固化に十分な時間起こさせることが極度に重要であり、きもないと収率が減ずることを示す。維接を10mMCaClaに調節した後、たっぷり10分インキュペーション時間をとり、ペレット及び上滑フラクションを関節数2分間隔で計数した。図4は、CaCla系加援初めの数分間は上席に存在するPHBの量はペレットにおけるものより確かに大であることを示す。しかしながら8分後(ペレット中に測定されたPHBの量は、平らになり始める)ペレットにおけるPHBの量は、上清フラクションにおけるものよりずっと多い。この時点で、この実験は、そのほとんどが14CーグルコースとしてPHBに取込まれ(約60%に取込まれる)るが、その最らかは特解性物質として存在する放射活性14炭素を過速することに注意すべきである。従って、ほとんど全てのPHBが沈繰しても無解性放射活性グルコースのために依然として上油に多くの数の計数が存在

MgOAc ++++
NgOAc ++
KCL KOAc CgCl₂ ++++

*金工の溶液は1Mの最終適度であった。**固りは各集合体のミクログラフを 用いて主要的に格付けした。「++++」は最善の面りを示し、「+」は最低量の面 りを示す。「-」は面りのないことを示す。

表3に載つかのイオン溶液が形質転換されたイー。コリに生成したPHBを簡化することを示す。最長の固化剤は固りの速度及び大きさに関する主観的判定に基づきCaClaであった。CaClaの固化効果は、その固生エイ、エウトロフスに生成したPHBを固化しない(即ち、PHB粒子は稼解したアルカリゲネスH16エウトロフスから得られた、塩化カルシウムで処理して動化が概象されない変動がなされた)。

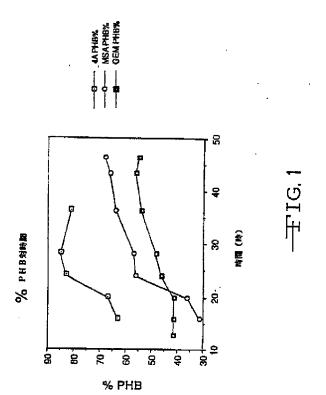
実験はPドBを駆化するのに用いるCaClaの理想的過度を決定するためにな した。実験において、形質転換されたイー、コリ細胞を開製し、上述したように 治解した。次いで溶液は、1M貯蔵CaCla溶液を用い異なるaMCaCla濃度と した。伝義度のCaCla。例えば1aMでは、PHB粒子を簡化するのに非常に長 時間を要し、少しの節化体しか免成しなかった。高濃度のCaCla、例えば10 0aM及びそれ以上では、節化はほとんど瞬間的に起こり、大きな5世のフレーク」 様位子となり、管の底に被もった。しかしながら高濃度のCaClaで得られた固 りは大量の翻胞接触を育するように見えた。従って高温度のCaClaで得られた固 りは大量の翻胞接触を育するように見えた。従って高温度のCaClaで得られた重 ましくない。中濃度のCaCla、例えば5aMないし80aMを用いた場合、ベレッ トを作った培地の節化が長ないし15分の類いインキュペーションで起きた。節 化物形成の速度及び大きさの点で最長の箇化結果を生ずるために10aMCaCla の使用が快度された。

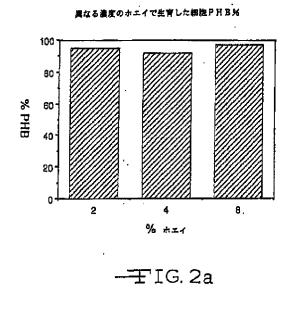
する。

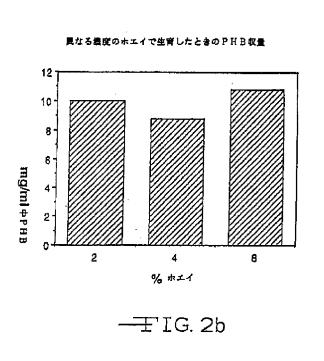
図5は、PHBの関化を稼形成剤、係えばバイオ101から入手できるガラスミルクの脈加により強めることができることを示す。窓5において、ベレット及び上摘の分当りの計数(CPM)を表わし、「+ga.+Ca.jはガラスミルク及び10mMCaCl.o存在でのPHB関化を示し、「-ga.jはガラスミルは存在せず10mMCaCl.o存在でのPHB関化を示し、「-ga.,-Ca.jはガラスミルク及びCaCl.o不存在でのPHB関化を示し、モレて「--Ca.jはガラスミルクの存在下、CaCl.o不存在下でのPHB関化を示す。図5から、複形収剤の添加による関化の強化は、それほど大きくなり、従って、大量の生成計画ではこのような剤の使用によって大きな利益が与えられることはないことが刺る。

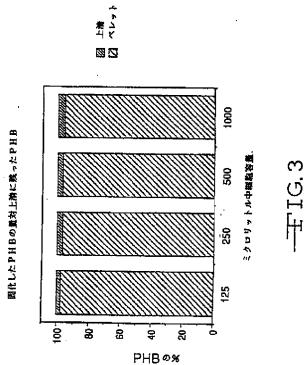
本発明は、大量のPHBを審領できる形質販換されたイー。 コリ株を処理して方、PHB生成のため安価な炭素板、例えばホエイを使用し、イオン溶液、例えばてよる1gがPHBを関化するのに使用できるその好ましい実施建築に関して記載されたが、この分野の音楽者は本発明が添付された時次の範囲の精神及び範囲内で体施して実施できることを理解するであろう。

特表平5-507410 (5)

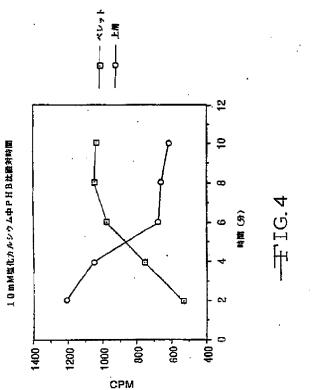


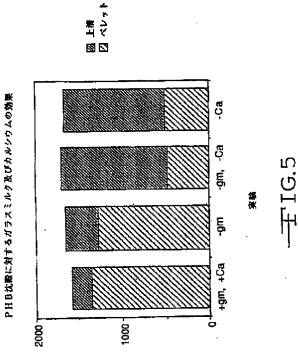






特表平5~507410(6)





圣 約 書

方法はPHB生合成経路をコードしている遺伝子を含む形質転換されたイー、コリ常主からPHBの模製を増強することを提供する。PHBをコードしている遺伝子をラクトース利用系を含む宿主に挿入することによりホエイを含んでいる安価な最小地地をPHB生成のための食物及び検索原として用いることができる。PHB生成経路プラス経路において、最初と最後の遺伝子のどちらかの側の40の余分の塩器をコードするプラスミド、p4Aは、宿主に挿入され、他のプラスミド構造物よりも短時間に大量のPHB響限を生成することを示した。CaC1は形質転換されたイー、コリ首主に生成したPHBを配化するための効果的な個化剤であることを示した。

Gaiachea 3-maps 435/136, 155, 243, 252,3, 251,33, 180, 320,1; 536/1.1, 26, 27, 28, 29, 124, 127 Decommende tempers state that the man Description on the Estate Court out Decommen are treatment in the Figure State Caline Search Words: poly hydrotybutyrate, transform? recombin?, clen?, bantaria, ferment?, whey, aploamerat?, magnation, calcium, 101 Consent December. - evenements, one in consent seasons of JUNEAL OF MACTERISHICAY, Vol. 170, No. 10, issued October 1988, Shater et al., "Closing and Expression in <u>Emberichia coll of the Alcalizerama outrophus</u> Alf-Poly-beta-Mydrokybutyrethe Biosysthekic Pathway", pagest 4431-4435, see muire decument. TRENC IN MIDTECHNULOGY, Vol. S, insued September, 1987, 1-26 byrms, "Polymer Synthesis by Histocrysmiska: Technology and Examenics", pages 246-220, see entire focument. Ţ US.A.A.743.433 (Abern et al.) 10 May 1988, see Abetract 10-13. 17 Ayers et al., "Mitrobiology of foods" published 1990 by W.R. Francisco), see pages 191-192. 7 10-13. 17 US.A.4.396.763 (Touchiye at al.) 02 August 1983, see column 1, lines 20-31 and 43-47. 10-21 US,A.4,950,749 (JohnI et ml.) Zl August 1990, mee abstract. 14-16. L8-21 17 SEP 1991 EA/US

PCT/US91/03547

1	
i i	
ſ	
1	

*** PCI/US0/0547

T. DESCRIPATIONS WHELE GERTAN CLARES WERE FOUND UNREARES

I. claims 1-9.13-17,24.25 down to a first product (host) and first process of use (product HS).

II. Claims 10-12 draws to a second product (culture action).

Sing distances of the process of the

A. No remained adultament opposes from even timely hald by the negligent, Cotton tra enventued field droplinary in the making & M distanced by statementalists;

As an executable distinct would be consisted intraces often jumilying limits propriet of any productive (eg.).

第1頁の続き

@Int. Cl. *

織別配号

庁内整理番号

#(C 12 P 7/62 C 12 P 7/62 C 12 R 1: 19)

8114-4B

CONTRIDATION SECTION VI

- III. Claims 18-21, 25 drawn to second process (recovering PMS).
- IV. Claim 22 drewn to a third product (DNA sequence).
- V. Claim 23 drawn to a fourth product (plantid vector).

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載 【部門区分】第1部門第1区分 【発行日】平成11年(1999)1月12日

【公表番号】特表平5-507410

【公表日】平成5年(1993)10月28日

【年通号数】

【出願番号】特願平3-510838

【国際特許分類第6版】

C12N 15/00 1/20

1/21

C12P 7/62

//(C12N 1/21

C12R 1:19

C121(1.13

(C12P 7/62

C12R 1:19)

[FI]

C12N 15/00

1/20 A

1/21

C12P 7/62

多数辅正的

10. 5. 20

平成 年 月 🗅

特許庁長它 党 井 寿 光 殿

適

1.事件の表示 平成3年特許顕第518838号

2 報正をする者

事件との関係 出 劇 人

名 称 センター・フォー・イノベイディブ・ チクノロジー

8代 璵 人

住所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 電路(代)3211-8741

氏名(5995) 护理士中村 裁



4.補正命令の日付 自 秀

5. 被正好多考點之 四和書

B. 補正対象項目名 - 請求の範囲



7. 補高の内容 別級記載の通り

請求の極重

- し ポリーβーセドロキン的能数生会成認器をコードするデオキシリボ検験を含むペクターにより影質転換されたラクトース利用系を有するエセリキャ・コリ 細菌原中。
- 2. 世デオキシリボ極酸配列が、該ボリーβーセドロキシ酸酸塩生合較純速の3 つの遺伝子配列の最初の遺伝子配列より前に位置する該テオキシリボ機酸配列 内の第1の400まクレオシド塩基及び設ポリーβーモドロキシ経液塩生合成 経費の故3つの遺伝子配列の3番目の遺伝子配列より彼に位置する該デオキシリボ機能配列内の第2の4009クレオシド塩基を含む請求項1記録のエセリャア・コリ面面指す。
- ATCC等能器号68329を有する需求項2記載のエセリキア・コリ知識 格主。
- 4. 政治主がエセリキア・コリ森HMS 174から誘導される精宗項1記載のこ セリキア・コリ細菌宿主。
- 5. 数ペクケーがプラスミドゥT2180である朝泉項1記機のエセリキア・コリ知研管主。
- 6. ボリーターヒドロキン経験差集合成整路をコードするデオキシリボ接触配列を含むベクターにより影響転換されたエモリキア・コリ級管理であって、同項可能性のボリーターヒドロキシ高酸塩を生成するための政素額としてホエイを利用する能力を有することを特徴とするト型エモリキア・コリ細菌程序。
- 7. 被デオキシリボ線検配列が、 放水リーβーセドロキン隣壁塩生合定経路の 8 つの運伝子化列の量分の直伝子配利より前に位置する孩子オキシリボ核酸配列内の第 1 の4 0 0 x タレオシド塩基及び酸ポリーβーヒドロキシ病酸生白成経路の酸 8 つの運伝子配列の 8 番目の違伝子配列より後に位置する故デオキシリボ核酸配列内の第 2 の4 0 0 x タレオンド塩基を含む請求項 6 型級のエセリキナ・コリ銅輪担主。
- 8. ボリーβーセドロキシ南強進化合成純酶をコードするデオキシリボ核酸配気 を含むベクターにより形質拡張されたエセリキア・コリ和間官主であって、は 収可能量のボリーβーヒドロキシ高酸塩を生成するための食物素として最小時

地を利用する能力を有することを特徴とする上記エセリキア・コリ樹粛宿主。

- 9. 域デオキシリボ検査配列が、減ポリーターヒドロキシ前数塩生合成器剤の3つの電伝子配列の最終の遺伝子配列より前に依置する減デオキシリボ接強配列内の第1の400万トルコシド塩基及び輸売リーターヒドロキシ路数塩生合成経済の第3つの運伝子配列の3番目の遺伝子配列より後に位置するセデオキシリボ禁煙配列中の第2の400万とリオシド塩基を含むデ求項3割配収のエモリキア・コリ細胞径上。
- 10. 機小塔地及び未工イを含むが質整機されたエセリキア・コリ協工中において ボリ β ヒドロキン関節機を生成するための増強であって、該形質転換され たエセリキア・コリ特主は、ポリーβートドロキン関連塩生合成経路を含み、 ポリーβーヒドロキン関連塩を生成するための炭素酸としてはホエイを利用す る能力を有する、上充裕性。
- 11. な最小塔地が撤算地の20%であり、数水エイが数箱地の40%であり、および水が確認地の40%である滑水項10配紙の場施。
- 12. 0.6%Na. HPO. .
 - 0.1%KH2 PO. .
 - 0.1%塩化アンモニウム、
 - 0.05 緊塩化ナトリウム。
 - 5 8. 6 4 %/rc.
 - 0.612%試験マグネシウム。
 - ひもももちがチアミン、
 - 0.61%カザミノ酸及び
 - 4.6 公元エイ会会

を含む、形質転換されたエセリキア・コリ領 (四)においてポリーターとドロキシ野鹿四を生政会せるための差別。

13. 以下の政府を含むポリーカーヒドロキシ階酸の製造法:

エセリキア・コリ献南作主の歩きを挟約すること、各希主はラクトース利用 来を得し、各権主は、ポリー6ーヒドロキン蘇聯塩を合成延時をコードするチ オキシリボ核聴配列を含むベクターにより形質転換されている:

設工セリキア・コリ報酬宿主を溶解して溶液中に放ボリーβーヒドロキシ熱 環境を放出すること:

報題を扱いすること: 能数マグネシウム、塩化マグネシウム、衝域マグネシウム及び塩化カルシウムからなる存から遺伝れた十分量のイオン製業を加えること、後十分量の凌イオン製薬を加えること、後十分量の凌イオン試薬は淡溶液中、核ボリーβ ヒドロキン保険版を提化する;及び

財政権を進心して美置化したポリーβーヒドロネシ顕確ななベシット化すること。

- 19、核イオン試験が提化カルシウムである関求項18記職の方法。
- 20、成塩化カルシウムが1モル~1ミリモルの間の過度を有する箭水項:8 記載の方法。
- 21. 独塩化カルシウムが10ミリモルの過度を有する請求項20記載の方法。
- 82. ポリーターヒドロキン配配塩生分支経路の3つの遺伝子配列の最初の遺伝子 配列より前に位置するDNA配列内の第5の405のボケレオンド塩蒸及びポリーターヒドロキン酢酸塩生介は経路の3つの遺伝子配列の3至目の遺伝子配列より機に位置するDNA配列内の第2の400スクレオンド塩粧を含む、推製され、分離されたDNA配列。
- 23. ユセリギア・コリ株社MS174により再配番号 18829の下にジ・アメ リカン・タイプ・カルチャー・コレクションに新託された、p4Aという名称 のプラスミド。
- 84. ベクターかり 4 Aプラスミドを含む静水項 1 3 記載の方法。
- 25. ベクターがp4Aプラスミドを含む蓄水項17記載の方法。
- 28. ベクターかp 4 Aプラスミドを含む需求項 1 8 記載の方法。

ホエイを含む最小培地に2 4時間よりも長い期間、エセリキア・コリ独員信 至の数は妻を生質すること、数エセリキア・コリ細菌権主の各々は細胞内にポ リーβーヒドロキシ略級数を生成する;

数格量中に終エセリキア・コリ細胞団主を確解し、格接中に数ポリーβーヒ ドロキシ酸酸塩を放出すること:及び

故ポリーカーヒドロキシ階積幅を採取すること。

- 14. 採取する策段階が、物解したエセリキア・コリ細胞電主及びポリーターヒド ロキシ需要塩を含む減速液を保験マグネシウム、塩化マグネシウム、配銀マグ ネシウム及び塩化カルシウムからなる料から固まれたイオン試費にさらす股階 を含み、第イオン試慮は達ポリーターヒドロネン保備塩を同化するのに十分な 機度である、建業和13 記載の方法。
- 15. 献イオン協議が1モル~1ミリモルの間の選定の塩化カルシウムである谐球項14主機の方法。
- 18. 塩化カルシウムが10ミリモルの強度を有する清水項15記載の方法。
- 17. 以下の設階を含むポリーターとドロキシ酸酸の製造生:

エセリキア・コリ州南台王の著金を供給すること、各種主はホリー8ーヒド ロキシ鹿職塩生金球耗略をコードするデオキシリギ核酸配列を含むベクターに より形質転換されており、各党主はポリ 8-ヒドロキシ耐酸塩を失成するた めの政素額としてホエイを利用する能力を行する。

ホエイを含む最小増地に24時間より長い期間エセリキア・コリ無菌病主の 飲料養を生育すること、数エセリキア・コリ細菌核主の各々は細胞内にポリー 身一とドロキシ格殊地を生成する:

核等要に数エセリキア・コリ報題前型を磨解し、浴被中に数ポリーβ-ヒド ロキシ盤機塩を放出すること;及び

終ポリ β ヒドロキシ階級者を採取すること。

18. 以下の残酷を含む、形質拡張されたエセリキア・コリ細菌協正の差差中の、 細胞内に生成したポリーターヒドロキン酪酸塩を団収する方法であって、融価 主はポリーターヒドロキン酪酸塩生合収減増をコードするデオキシリボ技能配 測を含むベクターにより彫到板塊されていることを特強とする上記方法: